UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

1941-1942. — N° 35

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE DE LA DIPHTÉRIE PAR LE MILIEU DE MANZULLO

(Travail effectué au Laboratoire de Bactériologie et de Médecine expérimentale de la Faculté de Médecine)

THÈSE POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE

présentée et soutenue publiquement le mercredi 8 Juillet 1942

PAR

Pierre BOSQ

Ancien interne de l'Hôpital Sabatié,
Interne au Sanatorium départemental de La Meynardie,
Diplômé de Médecine coloniale de l'Université de Bordeaux,
Diplômé d'études supérieures médicales d'E. P.
Certificats : d'Hydrologie; d'Hygiène scolaire;
de Puériculture anté et post-natales.

Né à LACANAU (Gironde), le 21 janvier 1914

Examinateurs de la Thèse

MM. AUBERTIN, professeur ..... *Président.*
BONNIN, professeur .....
DE GRAILLY, agrégé ..... *Juges.*
SARIC, agrégé .....

BORDEAUX
IMPRIMERIE LIBRAIRIE DELMAS
6, Place Saint-Christoly

1942

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536523_0017

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

1941-1942. — N° 35

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE DE LA DIPHTÉRIE PAR LE MILIEU DE MANZULLO

(Travail effectué au Laboratoire de Bactériologie et de Médecine expérimentale de la Faculté de Médecine)

THÈSE POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE

présentée et soutenue publiquement le mercredi 8 Juillet 1942

PAR

Pierre BOSQ

Ancien interne de l'Hôpital Sabatié,
Interne au Sanatorium départemental de La Meynardie,
Diplômé de Médecine coloniale de l'Université de Bordeaux,
Diplômé d'études supérieures médicales d'E. P.
Certificats : d'Hydrologie; d'Hygiène scolaire;
de Puériculture anté et post-natales.

Né à LACANAU (Gironde), le 21 janvier 1914

Examinateurs de la Thèse

MM. AUBERTIN, professeur ..... *Président.*
BONNIN, professeur .....
DE GRAILLY, agrégé ..... *Juges*
SARIC, agrégé .....

BORDEAUX
IMPRIMERIE LIBRAIRIE DELMAS
6, Place Saint-Christoly

1942

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

DOYEN : M. MAURIAC.
ASSESSEUR : M. LABAT.
DOYEN HONORAIRE : M. C. SIGALAS.

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. DENIGÈS, BEILLE, CHAVANNAZ, C. SIGALAS, SABRAZÈS, BÉGOUIN, DUPOUY, A. MANDOUL, PETGES, GUYOT, ABADIE.

PROFESSEURS :

	MM.		MM.
Clinique médicale	MAURIAC.	Zoologie et parasitologie	R. SIGALAS
id.	DUPÉRIÉ.	Médecine expérimentale	AUBERTIN.
Clinique chirurg. et gynécol.	JEANNENEY.	Clinique ophtalmologique	N...
Clinique chirurgicale	PAPIN.	Clinique chirurg. inf. et orthop.	ROCHER.
Pathologie et thérapeutique gén.	CARLES.	Clin. méd. des mal. des enfants.	N.
Clinique d'accouchements	ANDÉRODIAS.	Chimie biologique et médicale	MACHEBŒUF.
Anatomie pathol. et microsc. clin.	DAMADE.	Physique méd. et pharmaceutique.	WANGERMEZ.
Anatomie	VILLEMIN.	Méd. col. et clin. mal. exotiques.	BONNIN.
Anatomie générale et histologie.	G. DUBREUIL.	Clin. malad. cutanées et syphilit.	JOULIA.
Hygiène	LEURET.	Clin. des mal. des voies urinaires.	DUVERGEY.
Médecine légale et déontologie	LANDE.	Clin. mal. nerveuses et mentales.	DELMAS-MARSALET.
Electroradiol. et clin. d'él. médic.	RÉCHOU.	Clin. d'oto-rhino-laryngologie	PORTMANN.
Chimie	CHELLE.	Toxicologie et hygiène appliquée.	LABAT.
Botanique et matière médicale	GOLSE.	Hydrologie thérap. et climatol.	CREYX.
Pharmacie	VITTE.	Clinique odonto-stomatologique.	DUBECQ.
Physiologie	FABRE.		

MM. LACOSTE (Histologie). PÉRY (Obstétrique). PERRENS (Maladies mentales). CHARRIER (Chirurgie générale). FAUGÈRE (Obstétrique).

AGRÉGÉS EN EXERCICE :

	MM.		MM.
Anatomie	DUFOUR.	Chirurgie générale	POUYANNE.
Physiologie	FRANCK.	Obstétrique	RIVIÈRE.
Médecine générale	PIÉCHAUD.	id.	MAHON.
id.	DE GRAILLY.	Ophtalmologie	BEAUVIEUX.
id.	FONTAN.	Oto-rhino-laryngologie	DESPONS.
id.	BROUSTET.	Dermatologie et syphiligraphie	N...
id.	DERVILLÉE.	Physique médicale	N...
id.	SARIC.	Chimie gén. pharm. et toxicol.	CASTAGNOU.
id.	DUBARRY.	Histoire natur. pharmaceutique	GIRARD.
Chirurgie générale	LOUBAT.	Pharmacie	MESNARD.
id.	MASSÉ.	id.	GRANGER.
id.	DARGET.	Histoire natur. méd. et parasitol.	R. MANDOUL.
id.	MAGENDIE.		

COURS COMPLÉMENTAIRES :

	MM.		MM.
Médecine opératoire	LOUBAT	Ophtalmologie	BEAUVIEUX.
		Physique méd. et pharmaceutique.	N...
Accouchements	RIVIÈRE.	Anatomie	J. BEAUVIEUX
Puériculture	FAUGÈRE.	Chimie minérale	CASTAGNOU.
Zoologie et parasitologie	R. SIGALAS.	Botanique	GIRARD.
Médecine légale	DERVILLÉE.	Pharmacie galénique	MESNARD.
Urologie	DARGET.	Bactériologie	MOUREAU.
Législation pharmaceutique	POPLAWSKI.	Physiologie	LIARD.

Le Secrétaire de la Faculté : ROUGERIE.

Par délibération du 5 août 1879, la Faculté a arrêté que les opinions émises dans les Thèses qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle entend ne leur donner ni approbation ni improbation.

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

A MA MERE

Ta joie sera immense, Maman, lorsque tu recevras cette thèse.

Laisse Ton fils te l'offrir avec tout son amour et toute sa reconnaissance.

A MON PERE

Tu m'as toujours donné l'exemple du devoir.

Mais aujourd'hui, Papa, laisse-moi te redire : « Rien ne compte que la continuité dans l'action, et l'honneur du nom que tu m'as donné. »

A MA FEMME

Tu es la compagne chérie de ma vie, et ta grande tendresse fut pour moi un continuel réconfort.

A TOUS LES MIENS QUI NE SONT PLUS

Puisse l'hommage fervent que j'adresse à leur mémoire, tel une prière, arriver jusqu'à eux.

A MES BEAUX-PARENTS

Vous qui m'avez aidé parce que vous m'aimiez; n'en doutez pas, mon affection est aussi profonde.

A MON GRAND-PERE

A MES TANTES

A MON ONCLE

Pour qu'ils trouvent ici le gage de mon très affectueux attachement.

A MON BEAU-FRERE LOUIS

A MA SŒUR

A MA BELLE-SŒUR

Je suis votre frère, c'est pour cela que je vous aime, et la vie nous prouvera sans doute l'utilité de ce sentiment.

A MES PETITES NIECES CHERIES

A MON AMI

JEAN GARNUNG

Prends ce travail en souvenir de nos soirées laborieuses d'autrefois où tu m'écoutais patiemment, souvent fort avant dans la nuit, malgré tes journées de travail si pénibles. Mais aussi en souvenir de nos ardentes discussions sur des problèmes jamais résolus.

A MES CAMARADES D'EXTERNAT

A TOUS CEUX DU LABORATOIRE DE BIOLOGIE
DE L'HOPITAL SAINT-ANDRE

A MES CAMARADES D'INTERNAT A SABATIÉ

A MES MAITRES
DE LA FACULTE DE MEDECINE, DES HOPITAUX,
DE LA FACULTE DES SCIENCES

A Madame BORDES

A Monsieur BORDES

Contrôleur principal des Contributions indirectes.

A LEUR FILS JEAN

Amis très sûrs et très chers, je vous ai toujours trouvés à mes côtés, surtout dans les mauvais moments.

A TOUS MES CAMARADES

A Monsieur le Professeur M. MACHEBŒUF

Chef du Service de Chimie biologique à l'Institut Pasteur de Paris.
Professeur de chimie biologique
à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Bordeaux,
Docteur ès sciences,
Membre du Comité consultatif d'Hygiène de France,
Chevalier de la Légion d'honneur,
Officier d'académie.

Vous avez bien voulu vous intéresser à moi et me guider à l'Institut Pasteur de Paris.

Laissez-moi vous en exprimer ici toute ma reconnaissance.

A Monsieur le Docteur PHILIPPE

Ancien Chef de laboratoire à la Faculté de Médecine de Paris,
Chef du Laboratoire de la Diphtérie à l'Institut Pasteur de Paris,

Vous avez bien voulu, au cours de ma visite, porter quelque intérêt à ce travail.

J'ai essayé de tirer un profit maximum de vos conseils.

Merci, mon cher Maître.

A Monsieur le Docteur L. NARD

Chirurgien en chef de l'Hôpital Sabatié.

C'est en somme avec vous que j'ai commencé à saisir toute la beauté de l'acte chirurgical.

Mais aujourd'hui, où votre technique irréprochable et votre haute conscience professionnelle m'ont conservé ma mère, je crois vous devoir plus que de la reconnaissance, puis-je dire de l'affection.

A Monsieur le Docteur CRUCHET

Médecin des dispensaires antituberculeux de la Gironde,
Chef du Service de phtisiologie à l'Hôpital Sabatié.

Vous avez toujours été pour moi un guide bienveillant et éclairé.

Laissez-moi vous dire aujourd'hui toute ma respectueuse sympathie.

A Monsieur le Docteur TAUZIN

Médecin consultant de gastro-entérologie à Plombières.

Je crois que nous nous connaissons assez pour ne rien ajouter.

Mais vous savez ce que je pense.

A Monsieur le Docteur SERVANTIE

Chef adjoint du Laboratoire de biologie de l'Hôpital Saint-André,
Docteur de l'Université de Bordeaux, mention « Pharmacie »,
Chevalier de la Légion d'honneur,
Croix de guerre.

A Messieurs les Docteurs RAMARONY, MAUPETIT,
P. MOYSÈS et BASTEAU

Chefs de service à l'Hôpital Sabatié.

Aux Docteurs

OTTAVIANI
Chirurgien adjoint de l'Hôpital Sabatié,

DIARD
Médecin adjoint de l'Hôpital Sabatié.

LAFON
Médecin accoucheur.

En défrichant pour moi les sentiers souvent épineux de la clinique, vous m'avez appris à mieux connaître et surtout à mieux aimer la Médecine.

A Monsieur le Docteur DUSSERT

Ex-Assistant à l'enseignement de la tuberculose des Hôpitaux de Bordeaux,
Médecin chef du Sanatorium départemental de La Meynardie,

Vous m'avez accueilli avec une grande bienveillance et m'avez au maximum facilité ma tâche. Merci.

A Monsieur le Professeur agrégé SARIC

C'est vous qui, au laboratoire, m'avez constamment aidé, conseillé et guidé sans mesurer votre temps ni votre peine.

Laissez-moi vous en exprimer toute ma reconnaissance.

A Monsieur le Professeur agrégé de GRAILLY

Médecin des Hôpitaux,
Chef des travaux d'anatomie pathologique.

Je voudrais vous assurer de toute ma reconnaissance, mon cher Maître, pour les soins dévoués dont vous avez su entourer certains membres de ma famille.

A Monsieur le Professeur BONNIN

Professeur de médecine coloniale et clinique des maladies exotiques.
Médecin des hôpitaux,
Chevalier de la Légion d'honneur,
Croix de guerre,
Officier de l'Instruction publique.

Je voudrais vous exprimer ici toute ma reconnaissance pour la très grande amabilité que vous avez bien voulu toujours me témoigner.

A MON PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur E. AUBERTIN

Professeur de Médecine expérimentale,
Médecin des Hôpitaux,
Croix de guerre,
Officier de l'Instruction publique.

Grâce à votre bienveillance, j'ai pu m'initier à la technique du laboratoire, et en particulier à la technique bactériologique.

Vous avez bien voulu également accepter la présidence de cette thèse.

Aujourd'hui, mon cher Maître, je viens vous assurer de toute ma reconnaissance.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE

DU

DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE DE LA DIPHTÉRIE

PAR LE MILIEU DE MANZULLO

INTRODUCTION

La clinique demande au laboratoire la solution du diagnostic rapide et précis de la diphtérie. Aucun effort dans ce sens ne nous paraît donc devoir être inutile.

Entreprise il y a six mois avec l'intention d'être poursuivie sans réserve de temps, notre étude aurait désiré s'étendre non seulement à beaucoup plus de cas, mais aussi à plusieurs milieux : Manzullo, Clauberg, et peut-être Anderson, pour en donner ensuite une vue comparative avec la méthode classique. Hélas ! des conditions majeures, impératives, nous ont mis en demeure de suspendre notre travail. C'est pour nous une amère déception.

Aujourd'hui nous présentons à nos juges le résultat de notre travail jusqu'à ce jour. Connaissant l'insuffisance de notre étude, nous leur demandons d'être indulgents.

Nous souhaitons, dans un avenir que nous voudrions rapproché, reprendre des travaux dans ce sens. Car le sujet, si débattu certes, mais toujours neuf cependant, du diagnostic bactériologique de la diphtérie, reste d'un intérêt évident. Pour nous nécessité a fait loi.

Notre travail est donc bien modeste puisqu'il s'agit en fait d'une contribution à l'étude du milieu Manzullo. Parallèlement, nous avons effectué la technique classique de Loeffler au sérum coagulé, nous nous y sommes constamment référé. Ceci nous a été rendu possible grâce à l'obligeance de l'Institut Pasteur de Bordeaux.

Nous n'avons pas la prétention de prouver l'excellence d'un milieu vis-à-vis d'un autre. Notre expérimentation fut restreinte, c'est pourquoi nos résultats sont partiels. En exposant donc à la fois nos recherches et nos résultats, nous n'avons d'autre but que de permettre au lecteur de se familiariser avec l'étude d'un milieu encore assez peu connu, qui, s'il présente des inconvénients, présente aussi quelques avantages en ce qui concerne le diagnostic bactériologique de la diphtérie.

Avant d'entreprendre l'étude de ce milieu, il nous a paru utile de rappeler l'effort entrepris par les chercheurs pour améliorer la composition des milieux qu'ils préconisent, certains par simplification, d'autres par adjonction de substances nouvelles, dont les indicateurs colorés, tels que les tellurites alcalins, ne constituent pas de réel avantage.

Que l'on ne s'étonne donc pas de trouver d'assez longs préliminaires à l'étude du milieu Manzullo, qui, pour le moment du moins, étant donnée l'expérimentation relative à laquelle il a été soumis, nous paraît présenter surtout un intérêt de comparaison, chacun pouvant en tirer les conclusions diagnostiques et prophylactiques qui lui paraîtront les plus sages.

HISTORIQUE

En 1883, Krebs démontre l'existence dans les fausses membranes diphtériques d'un bâtonnet spécial auquel il attribue un rôle spécifique dans l'étiologie de la maladie.

En 1884, Loeffler cultiva et isola ce germe. Puis Roux, Yersin et bien d'autres s'attachèrent à l'étudier.

De cet ensemble persévérant de travaux variés s'est dégagée la sérothérapie, dont il est inutile de souligner l'importance.

Cliniciens et hommes de laboratoire vont donc contribuer à la lutte curative, préventive et prophylactique contre la diphtérie :

— curative, grâce à la sérothérapie;
— préventive, grâce à l'usage du vaccin spécifique;
— prophylactique, par la recherche des porteurs de bacilles.

Mais bientôt on décrivit des cas d'hypermalignité clinique de la maladie où le sérum était impuissant.

D'autres où des sujets vaccinés contractaient la diphtérie.

Enfin l'action prophylactique et sociale par la recherche des porteurs de germes conduisit à bien des désillusions.

En même temps, la prospection bactériologique va découvrir de nouvelles espèces de bacilles à type diphtérique. D'où la nécessité de rechercher un ou plusieurs tests d'identification du germe ayant quelque valeur.

Quoi qu'il en soit, l'examen clinique ne renseignant pas toujours sur la nature véritable d'un processus pseudo-

membraneux, le secours du laboratoire sera donc nécessaire. A plus forte raison si l'on se trouve en présence d'une inflammation apparemment banale, sans production d'exsudat pseudo-membraneux.

Ceci nous conduit donc à rechercher les moyens qui furent successivement étudiés pour mettre en évidence, le plus exactement possible, le bacille diphtérique.

La technique de recherche de ce germe est connue depuis plus de cinquante ans. Cependant le résultat de l'investigation bactériologique peut décevoir le clinicien qui attend une réponse précise du laboratoire pour instituer ou renforcer un traitement.

Mais si l'expertise bactériologique veut avoir quelque valeur, il faudra avant tout que le prélèvement soit correct...

Paraphrasant la formule célèbre, le laboratoire pourrait répéter : « Faites-nous de bons prélèvements et nous vous ferons de bons examens. » M. Melnotte nous dit : « Ce rappel ne semble pas inutile à qui a vu arriver au laboratoire des écouvillons de fortune dans des emballages improvisés, des prélèvements teintés de collutoire iodé ou de bleu de méthylène; à qui a vu, enfin, pratiquer à l'aveugle un prélèvement rhino-pharyngé sur un enfant rétif. Matériel stérile, prélèvement loin de tout gargarisme ou badigeonnage antiseptique et effectué sous le contrôle de la vue, telles sont les conditions nécessaires d'une expertise bactériologique correcte, en un mot prélever comme il faut, quand il faut, où il faut. »

En présence d'un syndrome diphtérique, le médecin pratiquera d'urgence la sérothérapie. Mais dans les cas frustes, moins évidents, retenu par la notion de la bénignité possible de l'affection et la possibilité d'accidents sériques, il demandera au laboratoire un avis compétent, il le demandera d'urgence.

Or, en bactériologie, rapidité et précision s'opposent formellement. Car le laboratoire ne saurait se contenter

de conclure sur l'existence d'un germe d'allure diphtérique.

D'où l'impérieuse nécessité de la création de milieux spécifiques où va se développer avec prédilection le bacille diphtérique.

C'est donc à la culture que le diagnostic va être en partie demandé.

Le problème a cherché sa solution dans de nombreuses méthodes. Chacune a ses applications et ses partisans.

Un des premiers avantages des milieux de culture est de nous montrer s'il y existe un bacille d'allure diphtérique. Mais encore faudra-t-il qu'ils nous révèlent des colonies faciles à identifier, composées de bacilles du groupe coryne bacterium (Lehmann et Neumann) et en particulier du groupe coryne bacterium à Gram positif; parmi lesquelles nous trouvons le bacille Loeffler (coryne bacterium diphteriae), le bacille pseudo-diphtérique d'Hoffmann (coryne bacterium commune), le bacille cutis (coryne bacterium cutis).

A ce propos, le Docteur Philippe, chef du laboratoire de la diphtérie à l'Institut Pasteur de Paris, a bien voulu nous donner des pseudo-diphtériques la définition liminaire suivante, que nous reproduisons *in extenso :*

« Un bacille pseudo-diphtérique est un bacille morphologiquement parent du diphtérique véritable, mais dont le caractère essentiel consiste dans une atoxicité absolue, combinée à une innocuité totale pour l'animal. »

APERÇU SUR LE METABOLISME DU BACILLE DIPHTERIQUE

Ces rapides notions nous paraissent nécessaires pour nous faciliter l'intelligence des divers milieux de culture.

En effet, les différents groupes d'éléments dont nous ferons mention sont apportés dans les milieux modernes, le plus souvent d'une façon masquée. Ce sont leurs rôles respectifs dans le milieu que nous allons étudier.

1° Rôle du pH. — Ce facteur influe surtout sur la toxigénèse, qui sera maxima lorsque le pH final de la culture est situé aux environs de 8. Dans le cas d'une acidification du milieu, la culture est peu toxique.

2° Rôle des facteurs chimiques. — Leur importance est difficile à apprécier; ils sont cependant indispensables dans le milieu.

Pour se développer, le bacille a besoin des albumoses et des grosses molécules de la peptone. Les travaux de Martin, Philippe et Loiseau montrent qu'on ne peut remplacer la peptone par des produits plus dégradés.

3° Rôle des acides aminés. — Ils vont constituer la source d'azote nécessaire au développement du bacille. En 1893, Utchinsky cultive le bacille diphtérique sur un milieu chimiquement défini.

Hadley, remplaçant l'asparagine par du glycocolle, obtient les mêmes résultats.

En 1929, Braum et Mundel obtiennent des résultats positifs en ajoutant de la cystine dans le milieu. Et ils donnent la formule d'un milieu synthétique dans lequel les souches de collection poussent difficilement alors que les souches récemment isolées du malade poussent facilement.

Ils montrent également que la culture en milieu synthétique exige notamment la présence de cystine.

Nous retrouverons cet élément dans la composition de nombreux milieux au tellurite de potassium, notamment le milieu de Clauberg. D'après Braum et Mundel, la cystine interviendrait donc de façon toute spéciale dans le métabolisme du bacille diphtérique.

Puis Howard et Mueller montrent le rôle des trois facteurs suivants :

— l'acide nicotinique;
— l'acide pimélique;
— le β-alanine.

En 1938, Koser montre que seule la β-alanine est nécessaire au développement du bacille diphtérique et que les acides nicotiniques et pimétique n'ont qu'une action favorisante.

4° Rôle des facteurs salins. — Leur importance sur le développement du bacille diphtérique a été démontrée par Raulin et Gabriel Bertrand.

Wadsworth et Wheler portent leur attention sur les sels de Ca. Ils pensent, que le Ca pourrait servir de cocatalyseur à une réaction euzymatique du bacille, bien que cette réaction n'ait pas été vérifiée, car, en réalité, nous ignorons les réactions diastasiques du bacille diphtérique.

En 1930, Locke et Main étudient le rôle des sels de Cu et de Fe. Ils montrent que l'élimination de ces sels d'un milieu n'influe pas sur la croissance du microbe.

Pour I. Sheef, l'addition de sels de Cu à l'état de traces

à un milieu augmenterait la pousse microbienne; l'effet contraire serait produit par les sels de Fe.

Bordet rapporte, au Congrès de microbiologie de langue française, qu'il pense que ce sel jouerait un rôle sur la respiration du bacille.

En fait, Boy pense que l'un des facteurs paraissant primordial pour l'étude des conditions chimiques du développement du bacille diphtérique est l'adaptation du microbe par de nombreux passages sur le milieu que l'on veut étudier. Et, malgré les résultats acquis à l'heure actuelle sur ce sujet, bien des inconnues restent encore à résoudre.

LES MILIEUX DE CULTURE DU BACILLE DIPHTERIQUE

Le bacille diphtérique est un germe aérobie facultatif; en anaérobiose stricte, son développement est faible.

Sa température optima de développement est de 35 à 37 degrés. La méthode classique de culture du bacille diphtérique est surtout une méthode élective, c'est-à-dire qui cherche à faciliter la pousse du bacille.

Soit qu'il s'agisse de bouillon de bœuf, et mieux de bouillon de veau peptoné, le bacille diphtérique trouble ce milieu assez rapidement. A la surface se développe un voile mince et peu à peu se dépose une masse cotonneuse, en même temps que le liquide s'éclaircit.

Le bouillon Martin présente des caractères identiques, mais le développement y est plus abondant.

La gélatine qui n'est pas liquéfiée donne des cultures minimes avec de petites colonies blanchâtres et punctiformes.

Avec la gélose ordinaire, on obtient des colonies se présentant sous forme de taches blanches un peu plus épaisses au centre qu'à la périphérie et se développant en trente à quarante-huit heures.

Dans cet ordre d'idées, la méthode de choix reste cependant la méthode de Loeffler, qui utilise le sérum de bœuf coagulé. Loeffler lui-même y préconisa l'adjonction de bouillon peptoné de veau dans une proportion de 1/3, 1/4 ou 1/5, suivant la formule suivante : 3 parties de sérum de veau, une partie de macération de viande de veau peptonée et sucrée à 1/100. Salée à 0,5/100: c'est le sérum peptoné de Loeffler.

On utilise le plus souvent ce milieu en tubes inclinés.

Après un temps variable de dix-huit, vingt-quatre et même quarante-huit heures de séjour à l'étuve, à 37 degrés, on peut voir apparaître des colonies. Elles ont la forme de petites taches rondes, blanc grisâtre, de la grosseur d'une tête d'épingle, parfois plus sombres au centre.

Sur ce milieu, le coryne bacterium diphteriae pousse le premier, mais d'autres germes voisins peuvent également s'y développer, et on peut y trouver du coryne bacterium commune et du coryne bacterium cutis.

Le sérum coagulé est incontestablement, parmi les milieux anciens, le plus avantageux, bien que, si dans le milieu se trouvent des anthracomorphes comme le bacillus subtilis, il y ait peptonisation du milieu.

C'est donc dans un délai de dix-huit à vingt heures que la méthode présentera son maximum d'intérêt. Cependant Zoeller a insisté avec juste raison sur la proportion parfois très importante des cultures tardives, surtout chez les porteurs de germes.

Petrini a pu donner le chiffre de 10 p. 100 de développements tardifs.

LES METHODES NOUVELLES

Elles présentent un intérêt évident, en ce sens qu'elles visent surtout, en améliorant l'électivité du milieu, à perfectionner également sa sélectivité en avantageant la pousse du bacille diphtérique, par rapport aux autres germes, et également la précision grâce à l'emploi d'indicateurs colorés dont le visage évident est susceptible de signaler la présence de colonies diphtériques.

Donc : électivité, sélectivité, précision, constituent les qualités majeures des nouveaux milieux introduits dans la technique bactériologique.

Et cependant sélectivité et enrichissement s'opposent. En effet, la sélectivité tend à donner des cultures trop malingres, alors que l'enrichissement du milieu va favoriser la croissance de germes associés.

Il faudra donc rechercher une juste harmonie entre la sélectivité et la richesse du milieu, de telle sorte que, grâce à l'indicateur coloré, on puisse faire le diagnostic de colonie diphtérique sans l'aide même du diagnostic microscopique.

Et l'on voit Rankin, en 1912, mettre au point un milieu dans lequel il utilise l'action empêchante du sulfocyanure de potassium; tandis que l'acidification du milieu glucosé par le bacille diphtérique est mise en évidence par le rouge neutre colorant en rouge les colonies. Il a laissé une formule de milieu que nous ne citerons pas, car il ne se rapporte pas à notre sujet des milieux au tellurite de K.

Dans le même ordre d'idées, Pesh fait appel au SO^4Cu comme substance frénatrice.

C'est Poppe qui chercha une amélioration de l'électivité

en ajoutant au milieu du glycérolat de liquides albumineux.

Calcaterra y ajoute de la lécithine.

Klein tente l'amélioration de son milieu par l'addition de gélose après traitement du milieu par la soude à 15 p. 100 et neutralisation.

Braun et Mundel y ajoutent de la cystine.

Lorentz préconise un milieu gélosé à base de soja et de cystine, milieu transparent pouvant être fondu et réparti extemporanément.

Pergola ajoute du jaune d'œuf.

Anderson, avec Mac Leod et Happold, ajoutent à la gélose du sang chauffé.

Gratch y ajoute du liquide d'ascite et du sang laqué. Clauberg, du glycérolat de sang et du sang laqué. Kowacs, de l'hématine. Steigler, de l'extrait hépatique.

En fait, cette diversité d'éléments n'est qu'apparente, et l'unicié de tous ces milieux nous apparaît en considérant que ces différents auteurs ont cherché a améliorer l'électivité de leurs milieux avec le minimum d'enrichissement, en y ajoutant des produits animaux plus ou moins dégradés.

Or, nous avons vu dans le chapitre sur le métabolisme du bacille diphtérique combien la biochimie moderne s'attache à éclairer et à expliquer le rôle de certains facteurs, tels que : l'hématine (groupe des porphyrines), les éléments salins, et certains acides aminés tels que la cystine, l'acide nicotinique et la β-alanine.

La véritable originalité des milieux modernes réside principalement dans l'addition aux milieux de culture d'indicateurs colorés.

Costa, Dauvergne et Troisier font appel aux milieux sucrés tournesolés.

Mais c'est principalement l'addition des sels de l'acide tellurique au milieu qui va constituer un élément intéressant d'identification microbienne.

Les sels de l'acide tellurique (tellurite de K ou de Na), en effet, peuvent être réduits pour donner du tellure métallique précipitant en noir dans le milieu aux points où se trouvent les colonies de bacille diphtérique. Malheureusement, comme nous le verrons en particulier au sujet du milieu Manzullo, cette propriété n'appartient pas, seulement au bacille diphtérique. Cependant, Flemming en 1932, montra que les sels de l'acide tellurique ont une action inhibitrice relative vis-à-vis du bacille diphtérique qui est susceptible de les réduire. Par contre, son action inhibante est beaucoup plus intense, vis-à-vis d'autres germes également réducteurs (bacille d'Hoffmann, streptocoque, staphylocoque).

De nombreux auteurs ont ajouté à leurs milieux des tellurites alcalins. Citons Douglas, Bifalco, Pergola, Clauberg, Manzullo, Kramer et Pesh, Allisson, Anderson, Gudel et Tiesh.

De ces diverses méthodes nous en retiendrons trois :

— le milieu d'Anderson;
— le milieu de Clauberg;
— le milieu Manzullo, qui est celui qui nous intéresse et qui fera l'objet du chapitre suivant.

Le milieu d'Anderson. — En 1931, dans un article paru dans le *Journal of pathology and Bacteriology*, Anderson, Happold, Mac Leod et Thomson, après avoir différencié le bacille diphtérique en trois types, préconisent un milieu permettant, selon eux, un diagnostic macroscopique de diphtérie.

Anderson et ses collaborateurs se basent sur le fait qu'un bouillon stérilisé par filtration est supérieur à un bouillon ayant été porté à l'ébullition pour la préparation des milieux de culture, sans doute à cause de la disparition à l'ébullition de certains éléments nécessaires à la croissance du germe.

Leur milieu est réparti en boîtes de Pétri. C'est un milieu dont la préparation est très délicate et qui est peu passé dans la pratique; nous ne nous y étendrons pas davantage.

Le milieu de Clauberg. — Cet auteur, en 1930, affirme que dans de nombreux cas la présence de colonies diphtériques dans son milieu peut être portée sur le seul examen macroscopique.

Modifiant sa formule en 1931, il propose un milieu à base de gélose, sang glycériné, déjà préconisé par Cantani en 1912.

Actuellement, l'Institut d'hygiène de Budapest emploie ce milieu à l'exclusion de tout autre.

Après fabrication, il n'est employé qu'après un séjour à l'étuve, assez prolongé afin d'éliminer l'eau de condensation. Après quoi le milieu se conserve quinze jours à un mois à la glacière.

Gurdel et Tutz ont proposé une modification de ce milieu et ont mis au point une technique permettant de l'obtenir immédiatement sans attendre six semaines le mûrissement à la glacière du glycérolat de sang.

Cette modification n'est guère pratiquée. Il n'en reste pas moins que le milieu de Clauberg est un milieu intéressant, sur lequel nous ne désespérons pas de pouvoir expérimenter.

LE MILIEU MAUZULLO

Dans un article de la *Folia Biologica* (Buenos-Aires, mai-août 1938), Manzullo publie ses résultats concernant un nouveau moyen de diagnostic bactériologique de la diphtérie.

Voici la composition de son milieu de culture :

« A 15 cm³ de bouillon de viande préparé avec de la peptone Parthe Davis et stérilisé, j'ajoute 1,5 cm³ de solution aqueuse de tellurite de potassium à 2,5 p. 100 (préparé sans chauffer et non stérilisé), ainsi que 1,5 cm³ de sang de bœuf défibriné recueilli aseptiquement. Il en résulte une concentration finale de tellurite égale à 0,16 p. 100.

» Ce mélange est fait au moment où l'on va se servir du milieu de culture, et réparti aseptiquement en tubes à essais (2 cm³ dans chacun). »

Sa technique est la suivante :

L'écouvillon est chargé de matériel suspect et mouillé dans le tube contenant le milieu de culture que l'on place ensuite en position très inclinée pour assurer une aération maxima. On laisse à incuber à 37° C. Après trois heures, on examine l'écouvillon. Ce dernier, en cas de développement du coryne bacterium diphteriae, présente des taches noires aux points où se trouvent les colonies de bacilles. Dans tous les cas, Manzullo fait un examen microscopique. Il obtient les résultats suivants :

	Etude bactériologique avec le nouveau milieu de culture.	Diagnostic clinique.	Nombre de cas.
	—	—	
Concordances	—	—	51
	+	+	43
Non-coïncidence	+	—	5
	—	+	1

Il y a donc une très grande proportion de cas où le diagnostic clinique + ou — est en rapport avec les résultats bactériologiques obtenus.

Manzullo ne considéra comme valables les résultats que nous venons d'exposer qu'après comparaison avec ceux obtenus à partir du milieu de « Horgan et Marshall » et l'inoculation à 2 cobayes de la flore microbienne développée sur ce dernier milieu, un des cobayes ayant reçu une injection de sérum antidiphtérique.

Poursuivant son expérimentation, Manzullo constate que des fragments de pseudo-membrane arrachés pendant le prélèvement et adhérents à l'écouvillon noircissent après trois heures d'incubation à 37 degrés, mais seulement quand le résultat de l'examen sera positif pour le bacille diphtérique vrai. En cas de résultat négatif, le noircissement ne se produit qu'après seize à dix-huit heures et d'une façon beaucoup plus atténuée.

Frappé par ce phénomène et désireux de l'éclairer, il mit successivement à l'étuve les substances suivantes :

1° fibrine de sang de bœuf;

2° fibrine de sang de bœuf avec 2 cm³ de tellurite de K à 2 p. 100;

3° fibrine de sang de bœuf + bouillon de viande + tellurite de K jusqu'à concentration finale de 0,16 p. 100;

puis :

4° fibrine de sang de bœuf + bouillon de viande + sérum normal de cheval et tellurite de K (0,16 p. 100);

5° fibrine de sang de bœuf + bouillon de viande + sang défibriné de bœuf et tellurite de K (0,16 p. 100).

Dans aucune de ces deux séries d'essais il n'a été obtenu de noircissement après douze heures d'incubation à l'étuve à 37° C.

L'idée de Manzullo était de se rapprocher de la composition de la fausse membrane diphtérique riche en fibrine.

C'est alors qu'il renouvela les essais précédents, mais après une imprégnation préventive de la fibrine de sang de bœuf dans une culture de coryne bacterium diphteriae âgée de vingt-quatre heures.

Après douze heures d'incubation, il obtient un noircissement avec l'essai n° 4 (fibrine, bouillon, sérum N de cheval, tellurite de K). Après six heures seulement avec l'essai n° 5 (fibrine, bouillon, sang défibriné de bœuf, tellurite de K).

La présence de bacille diphtérique vrai paraît donc jouer un rôle (virage au noir) dans l'évolution du milieu ensemencé.

Se basant sur la structure de la pseudo-membrane diphtérique, J.-A. Zuccarini suggère l'application directe d'une solution à 2 p. 100 de tellurite de K sur la formation suspecte.

« Si l'on touche, dit Manzullo, un exsudat pharyngien qui présente les caractères cliniques de la pseudo-membrane diphtérique avec un écouvillon chargé d'une solution de tellurite de K à 2 p. 100, cet exsudat présentera un noircissement persistant cinq à dix minutes après, et l'étude bactériologique avec la nouvelle méthode de culture démontre la nature diphtérique de l'exsudat. »

Par contre, l'application du même tellurite de K sur un exsudat pultacé cliniquement non diphtérique ne donne aucun résultat en même temps que l'étude bactériologique conclut à l'absence de bacille diphtérique.

Il est un point de technique important que l'on doit mentionner.

« Dans aucun cas, il ne faut toucher avec l'écouvillon imbibé de la solution de tellurite de K à 2 p. 100 la face postérieure de la langue du sujet, car cet organe est l'unique région de la cavité buccale qui noircisse avec le tellurite de K. »

Expérimentant l'épreuve de la touche sur 75 malades porteurs d'exsudats pharyngiens, Manzullo donne les résultats suivants :

	Méthode du toucher avec le tellurite.	Investigation bactériologique.	Diagnostic clinique.	Nombre de cas.
	—	—	—	—
Coïncidence	+	+	+	35
	—	—	—	34
	+	+	—	2
Non-coïncidence	—	+	—	1
	—	—	+	1
	—	+	+	2

Reprenant la formule célèbre dont nous avons parlé au début : « Faites-nous de bons prélèvements, nous vous ferons de bons examens », Manzullo note comme devant fausser les résultats, donc à éviter, l'action des produits thérapeutiques suivants : bleu de méthylène. H^2O^2, solutions d'acide tannique.

Par la suite, Manzullo va établir une relation entre les résultats obtenus au toucher avec la solution de tellurite de K et le diagnostic clinique.

Sur 38 cas, donnant un diagnostic clinique positif, 35 donnent un résultat positif avec le tellurite, 3 donnent un résultat négatif.

Sur 37 cas à diagnostic clinique négatif, 2 seulement donnent un résultat positif.

Enfin il établit la même comparaison, mais par rapport au diagnostic bactériologique.

Sur 37 cas où l'investigation bactériologique avait répondu +, 37 avaient donné un résultat positif au toucher.

Sur 38 cas négatifs au toucher, 3 seulement donnèrent un résultat bactériologiquement positif .

A partir de ces faits, Manzullo pense que vraisemblablement le noircissement (réduction à l'oxyde de tellure) est spécifique de la présence de coryne bacterium diphteriae pathogène. Il continue d'ailleurs des travaux dans ce sens.

Expérimentation personnelle.

Notre travail se résume dans les six points suivants :

1° épreuve de la touche (malades, convalescents et gorges normales);
2° épreuve de l'écouvillon;
3° ensemencement et lecture du milieu Manzullo;
4° ensemencement parallèle sur sérum coagulé;
5° isolement de germes et identification;
6° ensemencement du milieu Manzullo avec des souches de germes différents.

Composition du milieu. — La composition du milieu dont nous nous sommes servi est légèrement différente de celle qui a été préconisée par Manzullo.

A 15 cm³ de bouillon de viande ordinaire stérilisé, nous ajoutons 1 cm³ 5 d'une solution de tellurite de K à 2,5 p. 100 et 1 cm³ 5 de sang défibriné (bœuf ou humain).

Le prélèvement du sang animal a été effectué par ponction aseptique de la jugulaire du bœuf d'après la technique de Nocard.

La technique de récolte du sang humain est celle d'une ponction veineuse entourée de toutes les précautions d'asepsie ordinaires.

Dans les deux cas, on défibrine soigneusement le sang recueilli.

Après fabrication du milieu de culture, nous répartissons ce dernier en tubes stériles par 2 cm³. Le milieu est conservé à la température du laboratoire et employé soit le jour même, soit dans les jours qui suivent. Agé de trois à six jours, le milieu paraît ne plus être susceptible de servir. C'est un milieu à employer frais.

Nous voyons donc les légères modifications que nous avons apportées à la technique de Manzullo :

1° emploi indifférent de sang de bœuf ou sang humain;
2° usage dans un délai de un à six jours.

L'épreuve de la touche. — Nous employons une solution de tellurite de potassium à 2 p. 100 en eau distillée dissous à une température inférieure à 40° C. Cette solution ne doit pas être employée plus de vingt-cinq à trente jours après sa préparation. Un bon critère de conservation nous paraît être sa limpidité. Si la solution est trouble ou porte en suspension de trop nombreux débris elle est à rejeter. Les solutions doivent être conservées à l'abri du jour.

Les écouvillons dont nous nous sommes servi sont constitués par un tampon de coton enroulé très serré à l'extrémité d'une tige métallique, le tout mis en tube et stérilisé.

Il s'agit donc de toucher avec l'écouvillon chargé de la solution de tellurite de K à 2 p. 100 une amygdale recouverte de fausses membranes. N'en toucher qu'une de préférence, ce qui permet, par comparaison, de mieux lire les résultats sept à quinze minutes après. En cas de positivité, l'exsudat pharyngien touché a très nettement noirci. « Localement, on a l'impression que le sujet a avalé du charbon. »

Dans tous les cas, il faudra éviter de toucher la langue avec l'écouvillon chargé de tellurite de K; pour cela il faut obtenir à la fois une ouverture maxima de la cavité buccale et une protection maxima de la langue avec l'abaisse-langue métallique coudé d'un modèle courant. Pratiquée d'une manière très douce, la manœuvre ne traumatise pas le malade. Ceci a son importance en l'occurrence; en effet, nous avons un deuxième prélèvement à faire, et il y a intérêt à ne pas indisposer les sujets.

Ce deuxième prélèvement, destiné au milieu Manzullo, et dont nous allons parler dans un instant, se fait au moyen d'un nouvel écouvillon. Ceci se comprend facilement si l'on songe que la porportion de tellurite de potassium du milieu Manzullo est déterminée vis-à-vis des différents constituants et aussi vis-à-vis de la concentration

initiale en tellurite de K (pour 15 cm³ de bouillon, 1 cm³ 5 de tellurite K à 2,5 p. 100), alors que la solution de tellurite de K empoyée pour les touches est de 2 p. 100 seulement.

Les prélèvements. — Ils sont effectués par raclage léger en évitant tout traumatisme au niveau des fausses membranes. En cas d'angine rouge suspecte, on les effectue par glissage étendu au niveau du pharynx.

Les frottis. — Dans tous les cas, nous avons pratiqué sur place des frottis sur lame à partir de l'écouvillon chargé de matériel suspect, les frottis séchés étaient examinés.

Nous savons que cette méthode est vivement critiquée par certains auteurs. « L'examen microscopique direct après coloration du frottis sur lame est pratiquement inutile », dit M. Melnotte. « L'examen microscopique direct des exsudats ne permettra jamais de porter ou de rejeter le diagnostic de diphtérie », écrit Besson (*Technique microscopique*, 2, 1921).

Nous avons cependant pratiqué cette manœuvre, et dans bien des cas, les présomptions qu'elle nous donna paraissent avoir été confirmées par la suite. Nous disons bien les présomptions, car à partir de cet examen on ne peut rien affirmer.

Ensemencement et lecture du milieu Manzullo. — L'ensemencement des milieux Manzullo se fait avec les précautions aseptiques d'usage. Nous avons toujours procédé par agitation du milieu au moyen de l'écouvillon chargé de matériel suspect. Au préalable, nous ensemencions à partir du même écouvillon, un tube de sérum coagulé incliné de l'Institut Pasteur de Bordeaux.

Par la suite, les milieux Manzullo sont portés à l'étuve à 37° C. et mis en position inclinée très allongée pour favoriser au maximum l'aération. Si des bacilles diphté-

riques se développent dans le milieu on voit au bout d'un temps variable, le plus souvent vers la quinzième à dix-huitième heure, un fin dépôt noirâtre se former sur le tube au niveau de la partie la plus mince de l'étalement. Puis progressivement cette auréole de fins granulés gagne les parties plus profondes du tube, où elle devient plus visible, formée de parcelles noires précipitées de la grosseur d'un grain de sable à un grain de millet. A la périphérie de la lame d'étalement, le précipité reste fixé au verre, et, si l'on redresse le tube, le mouvement de chute du liquide en position horizontale laisse une ligne noire très visible en même temps que le précipité de la région moyenne de l'étalement s'écoule lentement vers la partie déclive du tube; à ce moment le milieu paraît nettement noir.

Exposé général de nos résultats.

Il nous a paru plus clair, pour l'intelligence de notre exposé, de donner d'emblée une vue d'ensemble de notre travail en reproduisant *in extenso* un tableau (ci-contre) numéroté par cas des prélèvements que nous avons effectués.

Puis nous examinerons les cas où nous avons effectué touche et frottis dans un simple but expérimental.

On trouvera :

— dans la première colonne du tableau, le diagnostic de probabilité porté à partir des frottis initiaux;

— dans la deuxième, le numéro des cas cliniques;

— dans le troisième, le résultat de l'épreuve de la touche;

— dans la quatrième, le noircissement + ou — de l'écouvillon, avant la douzième heure;

— dans la cinquième, le résultat de l'examen des frottis effectués secondairement (après noircissement) à partir des écouvillons;

LECTURE du frottis	N° des cas cliniques	TOUCHE	ÉCOUVILLON noircissement		MILIEU Manzullo			SÉRUM coagulé		NOTE CLINIQUE
			avant 3 h.	3 à 12 h.	24 h. ∨	24 - 48 h.	48 h. ∧	24 h. ∨	24-48 h. ∧	
Diphtérie :										
Probable ...	1	—		+	+			—	+	Diphtérie très récente cliniq. maligne E. A.
Probable ...	2	—		+	+			—	+	Diphtérie très récente cliniq. maligne E. A.
Probable ...	3	—		?	—	—	—	—	—	Le malade était arrivé porteur de fausse membrane.
Probable ...	4	+		+	+			—	+	Angine suspecte sans F. M.
Probable ...	5			+	+			+		Angine très douteuse.
Très probable (longs) ...	6	+		+	+			—	+	Angine à fausses membranes
Probable ...	7	+		+	+			—	+	Angine à fausses membranes
Probable ...	8	+		?	+			—	+	Angine à fausses membranes
Probable ...	9	—	+		+					Convalescent d'angine diphtérique.
?	10	—	—		—	—	—			Convalescent d'angine diphtérique.
Probable ...	11	—	+		+					Convalescent d'angine diphtérique.
Probable ...	12	—	+		—	—	—			Convalescent d'angine diphtérique.
Probable ...	13	—	+		+			+		Angine suspecte.
Probable ...	14		+		+			+		Angine suspecte.
?	15	—	—	—	—	—	—			Convalescent d'angine diphtérique.
?	16		—	—	—	—	—			Convalescent d'angine diphtérique.
Probable ...	17		—	—	—	—	—			Convalescent d'angine diphtérique.
Probable ...	18		+	—			—			Convalescent d'angine diphtérique.
Probable ...	19	+	+		+			+		Diphtérie grave très probable
Probable ...	20	+	+		+			+		Diphtérie très probable
Probable ...	21	—	+		+			—		Angine suspecte.
Probable ...	22	—	+		+			+		Angine suspecte.
Probable ...	23	+	+		+			+		Angine à fausses membranes
Probable ...	24	—	+		+			—	+	Angine suspecte.
Négatif	25	—	—	—	—	—	—	—	—	Angine pultacée.
Négatif	26	—	?	+	—	—	—	—	—	Angine à F. M. mais vraisembl. pultacée.
Négatif	27	—	?	—	—					Convalescent de diphtérie.
Négatif	28	—	—	?	—	—	—	—	—	Convalescent de diphtérie.
Probable ...	29	+	+		—	—	—	+		Angine suspecte à F. M.
Probable ...	30	+	+		+			+		Angine suspecte à F. M.
Probable ...	31	—	+		+			+		Angine suspecte à F. M.
Pas fait	32	—	?	?	—					État normal probable.
Pas fait	33	—								État normal probable.
Pas fait	34	—	—							Ancienne diphtérie.
Négatif	35	—	+							Tuberculeux avec syndrome rhino-pharyngé.
Négatif	36	—	+							Bronchite chronique + angine
Négatif	37	—	—		—	—	—			Convalescent de diphtérie.
Négatif	38	—	—		—	—	—			Convalescent de rhinite dipht.
Probable ...	39	+	?		+			+		Angine suspecte à F. M.
Négatif	40	—	suspect		—	—	—	—		État normal, mais contact.
Négatif	41	—	—	—	—	—				État normal, mais contact.
Négatif	42	—	—	—	—	—	—			Ancienne diphtérie.
Négatif	43	—						—	—	Angine à fausses membranes

— dans la sixième, les résultats à partir du milieu Manzullo :

1° tranche, noircissement en moins de 24 heures;
2° tranche, noircissement en 24 à 48 heures;
3° tranche, noircissement en plus de 48 heures;

— dans la septième colonne, les résultats obtenus à partir du sérum. Dans les cas de malades convalescents, le diagnostic bactériologique de diphtérie avait déjà été porté par l'Institut Pasteur.

La colonne correspondant au sérum coagulé est divisée en deux tranches.

— une portant les résultats + en moins de 24 heures;
— l'autre les résultats + en 24 à 48 heures et plus.

Enfin, on trouvera une dernière colonne avec, vis-à-vis de chaque cas, une brève note d'observation clinique.

Les gorges saines. — Nous avons fait des ensemencements sur le milieu Manzullo à partir des gorges de 20 sujets variés. 5 ensemencements ont été pratiqués en double. L'un des milieux étant âgé de plus de 15 jours l'autre milieu étant frais.

Voici les résultats obtenus dans le tableau ci-contre :

FROTTIS	NUMÉROS des cas	NOIRCISSEMENT Ecouvillon	MANZULLO			EXAMEN micros-copique secondaire après virage de l'écouvillon	OBSERVATION CLINIQUE
			< 24 h.	24-48 h.	> 48 h.		
Flore variée	1	0	0	0	0	flore variée	Enfant bien portant.
Flore variée, quelques diplocoques.	2	0	0	0	0	»	Femme 44 ans soignée pour ulcus gastrique.
Flore variée	3	0	0	0	0	»	Homme bien portant
Flore variée, nombreux bacilles ..	4	0	0	0	0	»	Homme sana.
Flore variée	5	douteux	0	0	0	»	Infirmier.
Flore variée	6	0	0	0	0	»	Infirmier.
Flore variée	7	0	0	0	0	»	Infirmier.
		Manzullo					
		> 15 j.	> 15 j.	> 15 j.	> 15 j.		
Flore variée	8	0 | 0	0 | 0	0 | 0	0 | 0	»	Enfant sana.
Flore variée	9	0 | 0	0 | 0	0 | 0	0 | 0	»	Enfant sana.
Flore variée	10	0 | +	0 | 0	0 | +	0 | +	All. dipht.	Enfant sana.
Flore variée	11	0 | 0	0 | 0	0 | 0	0 | 0	flore variée	Enfant sana.
Flore variée	12	0 | 0	0 | 0	0 | 0	0 | 0	flore variée	Enfant sana.
Flore variée	13	0	0	0	0	»	Enfant sana.
Flore variée	14	0	0	0	0	»	Enfant sana.
Flore variée	15	0	0	0	0	»	Enfant sana.
Flore variée, quelques diplocoques.	16	0	0	0	0	»	Enfant sana.
Flore variée	17	0	0	0	0	»	Enfant sana.
Flore variée	18	?	0	0	?	»	Enfant sana.
Flore variée	19	0	0	0	0	»	Enfant sana.
Flore variée	20	0	0	0	0	»	Enfant sana.

COMPARAISON DES METHODES ET DISCUSSION.

1° Résultats obtenus par Manzullo.
2° Résultats personnels.
3° Le sérum coagulé.

La touche.

Manzullo, au sujet de cette épreuve, établit une statistique portant sur 75 malades porteurs de fausses membranes.

Il pratique pour chacun d'eux : la touche, l'investigation bactériologique, le diagnostic clinique.

35 sont positifs pour les trois tests;
34 sont négatifs pour les trois tests;
2 sont positifs au toucher et à l'examen bactériologique;
1 est négatif au toucher, positif à l'examen bactériologique, et négatif au diagnostic clinique;
1 enfin est négatif au toucher, à l'examen bactériologique, et cliniquement positif.

Quant à nous, nous avons pratiqué la touche dans 38 cas, en particulier dans 11 cas d'angine à fausses membranes.

Voici nos résultats :

Dans 7 cas, par contact des fausses membranes, avec la solution de tellurite de K à 2 p. 100, l'épreuve de la touche fut positive.

4 fois elle ne le fut pas; dans 3 cas, comme il fut confirmé par la suite, il ne s'agissait pas d'exsudats diphtériques (cas 25, 26, 43 du grand tableau). Dans 1 cas, cette épreuve fut négative, bien qu'il se soit agi d'une angine diphtérique.

Dans les 28 autres cas (angines suspectes et convalescents récents de diphtérie bactériologiquement confirmée), l'épreuve reste constamment négative.

Il semble donc que la solution de tellurite de K à 2 p. 100 soit sans action sur les exsudats non diphtériques ainsi que sur les muqueuses seulement enflammées, même s'il s'y trouve du bacille diphtérique.

L'écouvillon.

Manzullo examine les écouvillons suivant sa technique que nous avons indiquée; dans 100 cas, il trouve :

51 cas bactériologiquement et cliniquement —;
43 cas bactériologiquement et cliniquement +;
5 cas bactériologiquement + et cliniquement —;
1 cas bactériologiquement — et cliniquement +;

ce qui donne environ 97 p. 100 de concordance.

Quant à nous, nous avons examiné l'écouvillon dans 69 cas. Objectivement, tout d'abord, y recherchant les points noirs révélateurs de colonies diphtériques (Manzullo), et microscopiquement après frottis étalés, séchés et colorés au Gram.

Nous avons trouvé :

51 cas + à l'examen macroscopique et microscopique;
8 cas douteux.

Donc là encore nos proportions se rapprochent sensiblement de celles de Manzullo.

Le milieu Manzullo.

L'auteur ne donne pas de résultats à ce sujet.

Nous avons ensemencé, comme on peut le voir sur notre tableau général, à partir de 28 gorges de sujets suspects de diphtérie : d'une part, sur sérum coagulé de l'Institut Pasteur; d'autre part en milieu Manzullo, âgé de un à sept jours.

Dans 18 cas, le milieu Manzullo avait noirci (+) avant 24 heures;

Dans 1 cas, il n'y eut aucun virage (l'examen microscopique fut d'ailleurs négatif).

Par contre :

Dans 11 cas, on eut un diagnostic + avec le sérum, résultat donné par l'Institut Pasteur, avant 24 heures;

Dans 7 cas, la réponse fut + après 24 heures;

Dans 1 cas, le sérum fut — et le Manzullo +;

Dans 8 cas, la négativité fut entière pour les deux milieux.

Dans le temps, le milieu de Manzullo paraît donc être plus rapide que le sérum coagulé. 18 cas contre 11, cela malgré la maigreur de l'expérimentation. Cependant cette différence ne nous paraît pas tellement notable.

Isolement de germes.

Le jeune L... fut hospitalisé aux Enfants assistés, avec un diagnostic clinique de diphtérie. Effectivement lorsque nous l'avons vu il paraissait très vraisemblable qu'il s'agissait de cette maladie.

La suite des tests précédemment énoncés (examen, touche, écouvillon, milieu Manzullo, sérum), fut effectuée chez ce malade. On put conclure à un résultat positif pour chacun d'eux.

C'est ce germe que nous nous sommes attaché à identifier le premier.

1° *Examen direct.* — Morphologie de diphtérique long.

2° *Repiquage en bouillon.* — Le germe y donne un voile et un dépôt.

3° *Repiquage à partir du bouillon sur gélose glucosée et*

sur gélose saccharosée. — La lecture quelques jours après montre :

— que le milieu glucosé a nettement rougi;
— que le milieu saccharosé a bleui.

La lecture est très nette par rapport au témoin, qui est violet.

4° *La décoloration à l'alcool.* — Nous savons que Lauger et Kruger pratiquant la méthode de Gram pour colorer les bacilles diphtériques constatèrent que si le bacille diphtérique vrai était très sensible à l'action de l'alcool, qui le décolore rapidement, par contre le bacille d'Hoffmann résiste à cette action. Aussi, en 1916, recommandèrent-ils l'épreuve suivante après l'avoir essayée avec l'alcool acétone, l'alcool chlorhydrique et l'alcool absolu. La technique est celle d'un coloration de Gram ordinaire, sous réserve de laisser agir l'alcool 15 minutes. Nous avons donc pratiqué cette méthode. Notre germe fut franchement décoloré.

5° *La gélose Veillon.* — Notre germe qui y fut repiqué poussa en surface et en profondeur. On sait que les pseudo-diphtériques poussent seulement en surface.

6° *L'inoculation au cobaye.* — Nous avons inoculé par voie sous-cutanée à un cobaye de 180 grammes 1/2 cm^3 de bouillon de culture âgée de vingt-quatre heures du germe en question.

L'animal meurt en vingt-quatre heures. A l'autopsie on note la présence d'œdème au point d'inoculation avec fausse membrane. Les capsules surrénales sont hémorragiques. On touche la fausse membrane avec un écouvillon imbibé d'une solution de tellurite de K à 2 p. 100 suivant la technique habituelle de l'épreuve de la touche. Il y a noircissement très net.

A titre de contrôle, on inocule concurremment un deuxième cobaye avec 1/2 cm^3 d'une culture en bouillon

de vingt-quatre heures faite à partir de la souche A.M.P^{s}. de l'Institut Pasteur.

L'animal succombe en quarante-huit heures. Signes d'autopsie identiques, mais sans fausse membrane au point d'inoculation.

A la suite de cette série d'épreuves : nous trouvons donc à notre bacille :

1° La morphologie diphtérique à l'examen direct;
2° Les caractères culturaux du bacille diphtérique en bouillon;
3° L'action sur les sucres est identique à celle du bacille diphtérique vrai;
4° La décoloration à l'alcool est positive;
5° La culture sur gélose Veillon donne également les mêmes résultats qu'un bacille diphtérique vrai;
6° Mais c'est surtout la recherche du pouvoir pathogène expérimental qui va nous faire conclure.

Il semble donc bien que l'on se trouve en présence d'un bacille diphtérique vrai.

Ce qui a particulièrement retenu notre attention au cours de cette succession d'épreuves, c'est avec l'apparition de fausse membrane au point d'injection, le noircissement net de cette dernière au contact de la solution de tellurite de K. N'oublions pas non plus que le milieu Manzullo vira au noir avec ce germe d'une façon particulièrement intense, tandis que l'écouvillon noircissait en moins de trois heures.

Dans ce cas particulier, il nous paraît donc y avoir un rapport entre la présence d'un bacille diphtérique pathogène et la positivité des différents tests (touche, écouvillon, Manzullo) que nous avons invoqués.

Ensemencement du milieu Manzullo avec des souches de germes variés et avec un diphtérique exogène.

Nous avons ensemencé directement le milieu Manzullo, des boîtes de Pétri contenant du milieu de Clauberg, et

des tubes de gélose à partir de colonies pures de pneumobacille, Flexner x., Flexner y., staphylo et strepto), qui nous furent obligeamment prêtées par le laboratoire de biologie de l'Hôpital Saint-André.

Voici ce que nous avons obtenu :

	— 24 h.					24 à 48 h.					> 48 h.				
	Pnb.	Flex. x.	Flex. y.	Staph.	Strept.	Pnb.	Flex. x	Flex. y.	Staph.	Strept.	Pnb.	Flex. x.	Flex. y.	Staph.	Strept.
Manzullo ...		+ Noirciss.				+ Léger noirciss.	+ Noirciss. très net	+ Léger	+ Léger	+ Léger					
Clauberg		+ Noirciss.				+ Léger noirciss.	+ Noirciss. très net	+ Léger	+ Léger	+ Léger					
Gélose											Poussé	Poussé	Poussé	Poussé	Poussé

Les résultats nous ont paru être sensiblement identiques pour le milieu Manzullo et pour le milieu de Clauberg. Le milieu Manzullo paraît très électif pour Flexner, en particulier pour le type x, qui noircit le milieu d'une façon très sensible, alors que les autres germes étudiés ne le font noircir que légèrement.

Donc d'autres germes, et Flexner x en particulier, peuvent faire noircir le milieu Manzullo par réduction des sels de potassium de l'acide tellurique. Nous avons mentionné d'ailleurs tout au début qu'il était déjà connu que le coryne bacterium diphteriae n'en avait pas l'apanage exclusif.

Mais il faut remarquer que les germes que nous avons

repiqués étaient issus de souches pures. Cela aussi a peut-être un rôle à jouer. De plus, Flexner ne se rencontre pas dans la gorge.

Par contre, le pneumobacille et surtout le streptocoque et le staphylocoque en sont les hôtes banaux. Ils pourraient donc éventuellement fausser les résultats, bien que le milieu Manzullo soit beaucoup moins sélectif pour eux que pour le coryne bacterium diphteriae vrai.

De plus, le virage ne fut net que près de quarante-huit heures après l'ensemencement, alors que le bacille diphtérique pousse généralement et fait noircir le milieu Manzullo en quatorze à seize heures.

En effet, il nous est souvent arrivé de constater que l'écouvillon, par exemple, qui n'a pas noirci après douze heures devienne noir après vingt-quatre heures, mais d'une façon beaucoup moins évidente que lorsqu'il s'agit d'un noircissement précoce avec présence de bacille diphtérique. Il s'agit d'une coloration beaucoup plus pâle, presque grise.

Nous avons observé le même phénomène avec le milieu Manzullo. Ceci donc nous incline à penser qu'il y a intérêt à user de ce milieu le plus rapidement possible après sa fabrication.

Pour terminer nous mentionnerons également l'ensemencement sur milieu Manzullo d'un germe à allure de bacille diphtérique moyen isolé du pus d'une pleurésie purulente par le Professeur agrégé Saric.

Ce germe a fait nettement noircir le milieu Manzullo en moins de vingt-quatre heures.

Identification ;

1° Sur gélose glucosée, il y a virage au rouge; sur gélose saccharosée, virage au bleu.

2° Par décoloration à l'alcool, elle est difficile à effectuer et la lecture en est douteuse.

3° Par la culture sur gélose Veillon, il semble que nous obtenions les caractères d'un bacille diphtérique vrai.

Sans conclure, il semble bien que l'on se trouve en présence d'un bacille diphtérique exogène, qui, lui aussi, noircirait le milieu Manzullo.

Les pseudo-diphtériques.

Grâce à l'obligeance du Docteur Philippe, de l'Institut Pasteur de Paris, nous avons pu, au Laboratoire, ensemencer par groupe de deux tubes le milieu Manzullo à partir de souches pures de :

bacille d'Hoffmann;
bacille cutis;
bacille diphtérique isolé de l'eau de la rivière jaune;
bacille diphtérique chromogène (orangé),

en même temps que nous repiquions également sur milieu Manzullo à titre de témoin le bacille diphtérique pathogène L. que nous avons isolé.

Voici ce que nous avons obtenu :

	Hoffmann	Cutis	Diphtérique rivière jaune	Diphtérique chromogène	Diphtérique pathog. L
— de 24 h.	0	très légèr^{t} +	0	0	+ +
+ de 24 h. à 72 h...	0	très légèr^{t} +	0	0	+ +

Donc, léger noircissement avec le bacille cutis, mais bien pâle à côté de celui qui est provoqué par notre bacille diphtérique pathogène isolé; ceci serait bien en rapport avec ce que dit Manzullo, qui prétend que seul le coryne bacterium diphteriae vrai fait virer d'une façon nette son milieu de culture.

La dissociation du bacille diphtérique.

Nous ne l'avons pas recherchée; nous en dirons un mot cependant parce qu'elle fut particulièrement étudiée par Anderson, qui, en proposant son milieu au tellurite de K, avait particulièrement en vue l'étude de cette dissociation d'après l'aspect des colonies.

Et surtout parce que si cette question ne présente qu'un intérêt même spéculatif, elle serait cependant intéressante à étudier par la méthode de l'écouvillon dont nous avons précédemment parlé. C'est ce que nous nous proposons de faire si les circonstances nous le permettent.

On avait observé depuis longtemps que toutes les colonies de bacille diphtérique ne donnaient pas des aspects identiques. On en avait même fixé deux types principaux, qui existent en particulier sur sérum coagulé.

En 1924, Hammerschild décrit deux types de bacille diphtérique, A et B, et des types intermédiaires.

En 1928, Parker note trois aspects différents des colonies.

Anderson pensa que ces aspects différents des colonies sur milieu au tellurite de K correspondaient à des types de bacilles différents.

Les petites colonies seraient données par les cas bénins de diphtérie, les grosses par les cas graves, et enfin il y avait un groupe intermédiaire. D'où la dénomination en types :

gravis;
mitis;
intermédius.

Mais tout ceci est très relatif; et Christiansen, effectuant plusieurs repiquages et des passages dans des bouillons à pH différents, passe d'une morphologie de type à une autre.

Parish, Watley et O'Brien, étudiant le pouvoir patho-

gène expérimental de ces différents germes, montrent que le gravis n'est pas plus pathogène que le mitis.

Mais la question est loin d'être résolue, et sans doute y aurait-il intérêt à l'étudier de nouveau.

La méthode de l'écouvillon à partir du milieu Manzullo, avec les colonies diphtériques différentes qui se développent rapidement à sa surface (souvent moins de 3 heures), nous paraît donc être intéressante à étudier à ce sujet.

CONCLUSIONS

De notre étude sur le milieu de Manzullo, nous pouvons dégager les trois tests suivants :

— le premier, que nous appellerons « l'épreuve de la touche »;

— le second, « l'épreuve de l'écouvillon »;

— le troisième, « le milieu Manzullo proprement dit ».

1° *L'épreuve de la touche.* — C'est une épreuve intéressante, mais seulement dans le cas où le malade est porteur d'exsudats pseudo-membraneux.

Nous avons vu, en effet, que cette épreuve, réalisée sur des malades atteints d'angine rouge, ne donne aucun résultat, car il ne se produit pas de noircissement au niveau des points mis en contact avec la solution de tellurite de potassium à 2 %.

Cette épreuve est également simple. En effet, il suffit d'avoir à sa disposition un écouvillon stérile et une solution de tellurite de potassium à 2 %.

La technique à utiliser est celle d'un badigeonnage localisé du pharynx. Nous y ferons une réserve : dans aucun cas il ne faut toucher la langue, car cet organe, comme nous l'avons vu, noircit au contact de la solution de tellurite de potassium.

Il y a donc là un premier facteur risquant de fausser les résultats.

Mais, à notre avis, il y en a d'autres, parmi lesquels nous citerons :

a) L'altération de la solution de tellurite de potassium à

2 %. Cette solution doit en effet rester limpide. Laissée en présence de la lumière, ou employée trop longtemps après sa fabrication (20 à 30 jours), elle se colore en brun très clair, en même temps qu'apparaît un léger précipité. A partir de ce moment-là il ne faut plus l'employer.

b) La lecture impartiale du noircissement au niveau de la fausse membrane touchée avec la solution de tellurite de potassium. Ceci veut dire que nous ne pourrons considérer cette épreuve comme positive que dans le cas où, après avoir pris les précautions indiquées, le noircissement des fausses membranes touchées sera très franc, « donnant localement l'impression que le malade a avalé du charbon ».

c) La simplicité de l'épreuve : ceci nous paraît constituer un sérieux écueil à sa vulgarisation. Le praticien qui en usera risque d'être mal informé sur sa valeur réelle, qui est en fait toute relative. Il ne faudrait donc pas se contenter des résultats donnés par cette épreuve « si simple » pour différer ou instituer une thérapeutique toujours urgente en cas de diphtérie vraie.

En résumé, il nous paraît que :

— l'épreuve de la touche pratiquée isolément ne présente qu'un intérêt spéculatif;

— mais si elle est associée à l'épreuve de l'écouvillon, à l'ensemencement du milieu Manzullo, à partir d'une gorge suspecte, à l'examen microscopique de la flore bactérienne de milieu Manzullo ayant noirci; alors cette épreuve peut être utile.

2° *L'épreuve de l'écouvillon.* — C'est le deuxième test que nous avons étudié. Nous en rappellerons brièvement la technique d'utilisation.

L'écouvillon stérile est chargé de matériel suspect pris au niveau de la gorge malade, puis immergé dans le milieu Manzullo qu'il doit ensemencer. Après quoi l'écouvillon remis isolément en tube stérile est placé à l'étuve à 37° C.

Cette épreuve ne manque pas d'intérêt. Elle nous donne des résultats concordant le plus souvent avec l'expertise bactériologique.

De plus, elle a un champ d'application plus vaste que l'épreuve de la touche, car elle ne nécessite pas la présence d'exsudat pharyngien pseudo-membraneux.

Enfin la surface mouillée de l'écouvillon constitue une région très aérée où les colonies de bacille diphtérique paraissent se développer rapidement (de trois heures à douze heures après l'ensemencement), noircissant inégalement cette surface de taches lenticulaires, souvent même plus petites. On dira alors que l'épreuve de l'écouvillon est positive.

Mais cette épreuve présente également des inconvénients.

a) Par une mauvaise appréciation du noircissement, qui peut, avec un examen trop tardif (après la 12e heure) conduire à des résultats erronés. Il ne faut pas oublier que d'autres germes que le bacille diphtérique peuvent noircir le milieu Manzullo et que l'écouvillon est imbibé de ce milieu.

3° *Le milieu Manzullo.* — Il constitue le troisième test de notre étude.

Après l'avoir étudié comme un moyen de diagnostic bactériologique de la diphtérie, nous trouvons peu de chose à son avantage. Et cela parce que nous avons établi une comparaison avec la méthode classique au sérum coagulé.

Si dans 18 cas cliniques nous avons constaté que le milieu Manzullo favorisait plus rapidement que le sérum coagulé le développement du bacille diphtérique, mis en évidence par le noircissement du milieu, nous avons trouvé aussi 11 cas cliniques correspondants, pour lesquels le sérum coagulé donnait un résultat positif avec développement du bacille diphtérique dans un temps sensiblement égal.

Il y a donc là un écart bien mince. Mais nous pouvons mal en apprécier la valeur, étant donné le nombre limité de cas cliniques qui ont servi à notre étude.

Et voici comment nous résumons les inconvénients du milieu Manzullo :

a) C'est un milieu facilement altérable; en effet, après six journées d'âge au maximum, on peut le considérer inutilisable.

b) La lecture du noircissement du milieu, après ensemencement, peut parfois être litigieuse. Quant à nous, nous n'avons mentionné dans notre étude que les cas où le noircissement fut évident. (Liséré d'un noir franc constitué de grains très fins, fixés au tube tout autour de la surface d'étalement inclinée du milieu de culture, avec, à la partie déclive du tube, un précipité noir de tellure formé de grains allant de la grosseur d'un grain de mil à celle d'un grain de sable.)

Mais il y a eu d'autres cas pour lesquels nous n'avons pas pu nous prononcer. Nous n'en avons donc pas fait mention.

c) A cause de son état liquide, le milieu Manzullo est difficilement transportable, ce qui constitue un handicap sérieux à sa vulgarisation.

d) D'autres germes enfin (streptocoque, staphylocoque, pneumobacille de Friedlander) peuvent faire noircir le milieu Manzullo, mais cependant d'une façon moins nette et moins rapide que le bacille diphtérique.

A cause de son noircissement précoce en quatorze à seize heures en présence de bacilles diphtériques, nous pouvons penser que le milieu Manzullo possède une certaine sélectivité vis-à-vis de ce germe.

Peut-être alors pourrait-on user de ce milieu dans un but prophylactique (recherche des porteurs de germes). Mais en fabriquant extemporanément le milieu.

En résumé, nous dirons qu'associé aux autres tests :

— épreuve de la touche;
— épreuve de l'écouvillon,

et, bien entendu, dans tous les cas examen microscopique sur frottis colorés au Gram faits à partir du milieu ayant

noirci, le milieu Manzullo peut être digne d'intérêt. A une seule condition cependant, c'est que l'on demeure — tous les tests étant concordants — dans le domaine des probabilités sans penser avoir fait un diagnostic bactériologique précis.

Mais si l'on en reste là, c'est que le problème n'est pas résolu, et il ne le sera que le jour où l'on aura trouvé, suivant l'expression de Manzullo lui-même, « le moyen de faire *in situ*, d'une façon rapide mais sûre, le diagnostic bactériologique de la diphtérie ».

SERMENT

En présence des Maîtres de cette Ecole, de mes condisciples, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine.

Je donnerai mes soins à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail. Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe; ma langue taira les secrets qui me seront confiés, et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime.

Reconnaissant envers mes Maîtres, je tiendrai leurs enfants et ceux de mes confrères pour des frères, et, s'ils devaient apprendre la médecine ou recourir à mes soins, je les instruirais et les soignerais sans salaire ni engagement.

Si je remplis ce serment sans l'enfreindre, qu'il me soit donné de jouir heureusement de la vie et de ma profession, honoré à jamais parmi les hommes et si je le viole et que je me parjure, puissé-je avoir un sort contraire.

Vu : *Le Doyen*,
PIERRE MAURIAC.

Vu, bon a imprimer :
Le Président,
E. AUBERTIN.

Vu et permis d'imprimer :
Bordeaux, le 25 juin 1942.
L'Inspecteur général de l'Enseignement supérieur,
Recteur de l'Académie,
A. LIRONDELLE.

BIBLIOGRAPHIE

ANDERSON, HAPPOLD, MAC LEOD et THOMPSON. — *Journ. Path a Bact.*, 31.

ANDERSON, J. HAPPOLD, F. C. MAC LEOD, THOMPSON. — *J. of. Path. and Bact.*, XXXIV, 667.

— *J. of. Path., and Bact.*, XXXVI, p. 169.

BORDET (P.). — Facteurs de croissance et toxigénèse. Rapport au Congrès de microbiologie, 1938, p. 96.

BRAUN et MUNDEL. — *Zentralblatt für Bakt.*, 103, 1927.

BRAUN et MUNDEL. — *Zentr. für Bakt. orig.*, 103, 182, 1927.

CALCATERRA. — *Zentralblatt für Bakt.*, 60, 1913.

CLAUBERG. — *Zentralblatt für Bakt.*, 120, 1931.

— *Münch Med. Woch.*, 82, 1935.

COSTA, TROISIER et DAUVERGNE. — *C. R. Soc. biol.*, 80, 1917.

COSTA, TROISIER et DAUVERGNE. — *C. R. Soc. biol.*, 81, 1918.

COSTA, TROISIER et DAUVERGNE. — *C. R. Soc. biol.*, 1917, XXX, 678.

COSTA. — *Ibid.*, XXX, 793.

— *Bull. et Mém. Soc. méd. des Hôp. de Paris*, 1917, 41, 991.

— *Presse Médicale*, 1919, 27, p. 113.

DAWIS LEWIS. — *J. of. Bach.*, t. V, sept. 1920, p. 477-488.

DOPTER et SACQUÉPÉE. — Bactériologie.

DURAND. — *C. R. Soc. biol.*, 1921, LXXXIV, p. 982.

EORS (M.). — *Orvosi Ketil.*, 1933, 77, 405.

FANAU (A.). — *Zentralbl. f. Bakt. orig.*, 72, 245.

GOLDIE (H.). — *C. R. Soc. biol.*, 1933, 114, p 602.

GOMETZ, J. DE GIOMEROS. — *Arch. de Med. Cir. y Especialid*, 1932, 35, p. 474.

GRATH (J.). — *Bull. Ist. Sieroster. Milanese*, t. X, 9.

HANNERSCHMIDT. — *Zentralbl. f. Bakt. orig.*, XCIII, 443.

Hida et Susuki. — *Kitasato Arch.*, 14, p. 263-313.

Horgan et Marshall. — *The Journ. of. Hyg.*, XXXVI, 554.

Hugounencq et Doyon. — *C. R. Soc. biol.*, 18 avril 1896.

Jones (L.). — *Proceed. Society of. exp. bio. and Med.*, 1932, XXIX, 32, p. 1133.

Klein. — *Deutsche med. Woch.*, 11 mars 1920.

Koser (St) and Rettger (L.). — *J. of. Infect. Dis.*, t. KXIV, 1919, p. 301.

— *J. of. Infect. Dis.*, 62, 1938, 209.

Loeffler. — *Zentalbl. f. Bakt.*, 1887, 2, 105.

Loiseau et Abt. — Sur les facteurs de variations du pH dans les cultures de bacilles diphtériques, *Annales Inst. Past.*, 1925, p. 115.

Lvoff. — Les facteurs de croissance des micro-organismes. — Rapport Ier Congrès de microbiologie, oct. 1938, p. 60.

Manzullo. — *Folia Biologica*, Buenos-Aires, août 1938.

Martin (L.). — *Arch. gén. de Méd.*, 1904, 2, 2644.

Melnotte. — *Revue d'hygiène*, t. 60, n° 10, déc. 1938.

Menton (J.). — *Journ. of. Path. and. Bact.*, 1932, XXXV, p. 651.

Menton, Cooer, Duke et Fussel. — *J. Hyg.*, 1933, XXXIII, p. 414.

Mustafa (A.). — *C. R. Soc. biol.*, t. 126, 1937, p. 558.

Pergola. — *Ann. d'Ig.*, 1922, 32, 669.

— *Bull. d'Ist. Serotherap. Milanese*, 1929, 7, 1585.

Petrini. — *Giorn. Batt. e Imm.*, 19 déc. 1937.

Philippe et Loiseau. — *C. R. Soc. biol*, 112, 1933.

Rankin. — *Journ. of. Hyg.*, 2, 1911.

Rankin (T. T.). — *J. of. hygiene*, 1911, II, 271.

Rouëssé. — Thèse Paris (Louis Arnette, édit.), 1934.

Roux (E.) et Jersin. — *Annales Inst. Past.*, 1888, 2, 269.

— *Ibid.*, 1889, 3, 373.

— *Ibid.*, 1890, 4, 385.

Roy. — Thèse Strasbourg, 1939.

Technique Microscopique, 2, 1921.

21931. — Bordeaux, Imprimeries Delmas, 6, place Saint-Christoly.